

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-030979

(43)Date of publication of application : 04.02.1997

(51)Int.Cl.

A61K 31/725
A61K 31/725
A61K 31/725
A61K 31/73
A61K 31/73
C08B 37/08

(21)Application number : 07-207404

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 24.07.1995

(72)Inventor : SUGIURA NOBUO
KUSHIMA YOICHI
OHIRA ATSUSHIKO
KIMATA HIROHARU
GOTO SACHIKO

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR NEUROPATHY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject therapeutic agent comprising a lipid-bonded glycosaminoglycan (lipid bonded GAG) or its salt as an active ingredient, having stretching promoting effect on neurite and recovery promoting action on neurological function, being expected to have reproducing effect on nerve fiber, etc., having extremely low toxicity.

SOLUTION: This therapeutic agent for neuropathy comprises a lipid-bonded glycosaminoglycan (lipid bonded GAG) or its salt as an active ingredient. The lipid bonded GAG, for example, is obtained by specifically cleaving a pyranose ring at the reduced end of GAG by oxidizing the saccharide residue at the reduced end of GAG to form carboxyl at the reduced end, subjecting the resultant substance to a lactone formation reaction, then reacting the lactone with a primary amine of a lipid to bond GAG to the lipid by covalent bond. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid, and their salts are preferable as GAG of raw material. A primary amino-containing phospholipid is preferable as the lipid. Dipalmitoyl- L-(α -phosphatidyl)ethanolamine-bonded hyaluronic acid, etc., are preferable as the lipid-bonded GAG. palmitoyl. phosphatidyl.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

18.07.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

特開平9-30979

(43) 公開日 平成9年(1997)2月4日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
A61K 31/725	AAB	A61K 31/725	AAB
	AAM		AAM
	AAP		AAP
31/73	AAQ	31/73	AAQ
	AAR		AAR
審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全14頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平7-207404	(71) 出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月24日	(72) 発明者	杉浦 信夫 岐阜県羽島郡岐南町徳田西1丁目68番地
		(72) 発明者	九島 洋一 東京都日野市多摩平1-9-3 第1富士 マンション102号
		(72) 発明者	大平 敦彦 愛知県春日井市神屋町713-8 コロニー 宿舎D-12
		(74) 代理人	弁理士 津国 肇 (外1名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 神経疾患の治療剤

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする神経疾患治療剤。

【効果】 末梢神経系又は中枢神経系の障害に起因する神経疾患、例えば、外傷性の神経損傷や神経欠損に起因する神経障害（特に体性神経障害、さらに特に感覚神経障害）、代謝障害性多発性神経障害、機械的神経障害、毒性神経障害などの種々の末梢神経疾患；ならびに、例えば、脳卒中、脳梗塞、脳出血、脳外傷、記憶障害、老年痴呆、アルツハイマー病やパーキンソン氏病などの疾患において、神経繊維が再生されることによって治療効果が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする神経疾患治療剤。

【請求項2】 神経疾患治療剤が神経突起伸展促進剤である請求項1の治療剤。

【請求項3】 グリコサミノグリカンが、コンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸である請求項1又は2記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする神経疾患治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】各種プロテオグリカンは細胞膜表面や細胞間のマトリックスに存在しており、サイトカイン類との結合や細胞間あるいは細胞-基質間の相互作用を介して、細胞接着、伸展、シグナル伝達などの細胞の応答性を变化させ、発生・増殖・分化・成長・老化・癌化及び免疫反応、炎症反応に対する応答性などに関係していると考えられている。

【0003】近年多くの種類のプロテオグリカンが神経組織に存在していることが判ってきた。そしてこれらプロテオグリカンが脳などの神経組織の形態形成や機能発現に密接に関与していると考えられるようになってきた (R.K. Margolis and R.U. Margolis, *Experientia*, 49, 429-446 (1993), A. Oohira et al., *Neurosci. Res.*, 20, 195-207 (1994))。

【0004】神経組織は、神経細胞の分化、移動、神経突起の伸展、標的細胞の認識、標的細胞とのシナプス形成・維持と再編成などの現象によってその形態が形成されと考えられている。

【0005】プロテオグリカンはコア蛋白質と呼ばれる蛋白質部分とグリコサミノグリカンと呼ばれる特異な構造を持つ糖鎖部分から成り立っている。脳中のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを神経細胞の培養系に添加すると神経突起の伸長を促進したり (N. Iijima et al., *J. Neurochem.*, 56, 706-708 (1991))、時には抑制したりする (A. Oohira et al., *J. Neurosci.*, 11, 822-827 (1991))。但し、多くの場合その活性はコア蛋白質部分にあり、グリコサミノグリカンの単独投与では効果がみられないとの報告が多い。一方、神経突起は高濃度のコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸が存在する領域には侵入できない (D. M. Snow et al., *J. Neurobiol.*, 23, 322-336 (1992))ことから、グリコサミノグリカンが神経突起伸展の方向付けをするガイド分子として機能している可能性も示唆されている。

【0006】このようにプロテオグリカンは神経系に作用して、末梢神経損傷や中枢神経障害の回復に有効である可能性が考えられるが、臨床的な検討はまだほとんど

行われていない。これはプロテオグリカンが巨大分子であり、そのままでは神経系には適用し難いことや、特にコア蛋白質部分に動物種間の違いがあり、抗体産生などの問題が生じるためと思われる。

【0007】一方、本発明者らは、先に脂質とグリコサミノグリカンとが共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンを合成し、それらが細胞接着阻害作用等の生物活性を有するのを見い出している (*J. Biol. Chem.*, 268, 15779-15787 (1993)、特開平4-80201、特開平4-80202、特開平4-82836、特開平5-236951、特開平6-72893)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、神経疾患の緒症状を改善する新しい薬剤を提供することを目的とする。特に、毒性等の副作用のない神経疾患治療剤を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、

- 1) 脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩を有効成分とする神経疾患治療剤、特に神経突起伸展促進剤
- 2) グリコサミノグリカンが、コンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸である上記薬剤を提供するものである。

【0010】本発明の神経疾患治療剤は、末梢及び中枢の神経細胞の神経突起伸展、及び神経損傷や神経欠損等によって障害を受けた神経機能の回復を促進することを特徴とする。

【0011】本発明の神経疾患治療剤の有効成分である脂質結合グリコサミノグリカンは公知物質である。例えば、特開平4-80201号公報又は特開平4-80202号、及び文献*J. Biol. Chem.*, 268, 15779-15787 (1993)に記載された化合物が例示される。しかし、本発明はこれに限定されず、グリコサミノグリカン（以下、GAGという）と脂質とが共有結合した脂質結合グリコサミノグリカンであれば本発明薬剤の有効成分として使用できる。

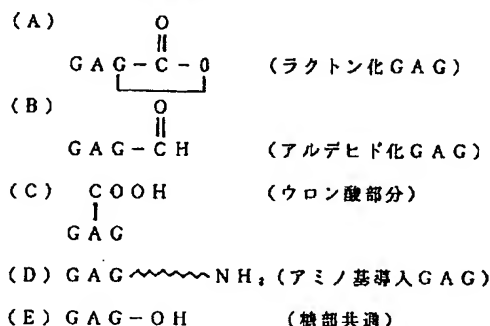
【0012】特に脂質結合グリコサミノグリカンは、GAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）、ホルミル基（ヘミアセタール基も含む）、水酸基もしくは1級アミノ基、又はGAGに別途導入された前記基と、脂質のカルボキシル基、ホルミル基もしくは1級アミノ基、又は脂質に別途導入された前記基との間で形成される酸アミド結合（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）、エステル結合又はアミノアルキル結合（ $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ）によって共有結合したものが好ましい。とりわけ、以下の結合を有するものが好ましい。

【0013】GAGの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたGAGのカルボキシル基（ラクトンを含む）と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）、GAGのウロン酸部分のカルボキシル基と、脂質

の1級アミノ基との反応によって形成された酸アミド結合(—CO—NH—)、又はGAGの還元末端のピラノース環を開環させ、化学的処理によって形成されたGAGのホルミル基と、脂質の1級アミノ基との反応によって形成されたシッフ塩基を還元して形成されたアミノアルキル結合(—CH₂—NH—)。

【0014】なお、上記共有結合に関与するアミノ基、カルボキシル基、ホルミル基(ヘミアセタール基を含む)、水酸基はGAG又は脂質に元来存在するもの、こ

(1) GAG又はその誘導体

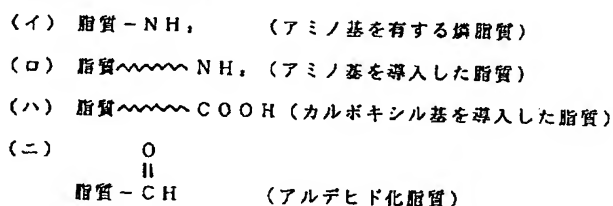


上式中、GAGはグリコサミノグリカン、~~~~~NH₂は導入されたアミノ基を示す。

【0017】

【化2】

(2) 脂質またはその誘導体

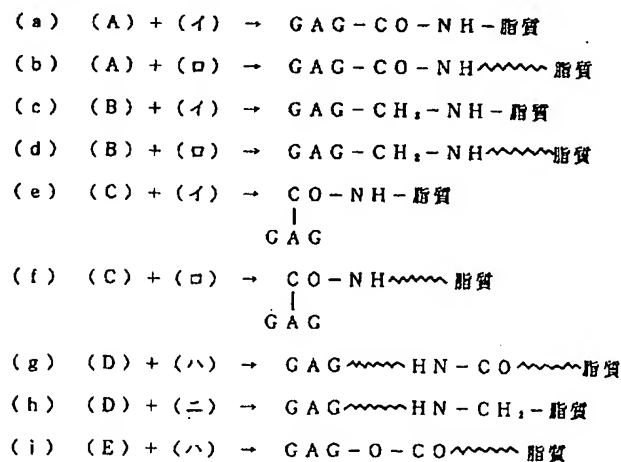


上式中、~~~~~NH₂は導入されたアミノ基を示し、~~~~~COOHは導入されたカルボキシル基を示す。

【0018】

【化3】

(3) 脂質結合グリコサミノグリカン



【0019】本発明で用いる脂質結合グリコサミノグリ 50 カンは、その塩であることができ、好ましくはナトリウ

れらに化学的処理をすることによって形成されたもの、あるいは上記官能基を末端に有するスペーサー化合物を、予めGAG又は脂質と反応させることによって別途導入されたもののいずれであってもよい。

【0015】脂質結合グリコサミノグリカンとその原料化合物との関係を模式的に示すと次の通りである。

【0016】

【化1】

ム、カリウムのようなアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムのようなアルカリ土類金属塩、トリアルキルアミンのようなアミン塩、又はピリジンのような有機塩基との塩であることができる。

【0020】原料のGAGは、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたもの、化学的もしくは酵素的に合成されたものなどのいずれも使用することができる。具体的にはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（A、C、D、E又はK）、コンドロイチンポリ硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸等が例示される。これらのGAGは通常使用される塩（例えばナトリウム塩）であってよい。但し、より効果的な神経疾患治療作用や神経突起伸張促進作用を得るためには、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸及びそれらの塩が好ましい。

【0021】原料の脂質は、動物、植物、微生物等の天然物由来、又は化学的もしくは酵素的に合成もしくは部分的に分解された複合脂質又は単純脂質を使用することができる。特にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルトレオニン、エタノールアミンプラスマロゲン、セリンプラスマロゲン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルイノシトール等のリン脂質、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の中性脂質等のグリセロ脂質が好ましい。とりわけ、1級アミノ基を有するリン脂質が好ましい。また、長鎖の脂肪酸、長鎖の脂肪族アミン、コレステロール類、スフィンゴシン、セラミドであってもよい。なお、脂質中のアシル基の鎖長及び不飽和度は特に限定されないが、炭素数6以上のものが好ましい。例えばパルミトイル（ヘキサデカノイル）又はステアロイル（オクタデカノイル）が例示される。また、これらの脂質は通常使用される塩であってもよい。

【0022】脂質結合グリコサミノグリカンの製造法は、特に限定されず公知の製造法（例えば、特開平4-80201号、特開平4-80202号参照）を採用することができる。代表的な製造法については以下に説明する。

【0023】還元末端限定酸化法

この方法は、GAGの還元末端の糖残基であるキシロース残基、ガラクトース残基、ウロン酸残基又はヘキシサミン残基を還元し、限定酸化（部分酸化）することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環（開裂）させるとともに、該GAGの還元末端にホルミル基を形成させてアルデヒド化合物とし、このアルデヒド化合物のホルミル基と脂質の1級アミノ基とを反応させて Schiff 塩基を形成させ、次いで Schiff 塩基を還元し、アミノアルキル結合（ $-CH_2-NH-$ ）を形成させて、GAGと脂質とを共有結合させる方法である。GAGの還元末端の糖残基の還元は、GAGに対して5～50当量程

度、好ましくは25～30当量の還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、ホウ酸塩緩衝液等）中、通常10～30℃、好ましくは15～25℃で行うことができる。上記還元後、限定酸化を行ってGAGの還元末端に特異的にホルミル基を有するアルデヒド化合物を製造する。限定酸化は、上記還元後のGAGに対して1～10当量、好ましくは3～6当量の酸化剤（過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム等の過ヨウ素酸アルカリ塩など）を用い、通常0～10℃、好ましくは0～4℃で行うことができる。得られたアルデヒド化合物と1級アミノ基を有する脂質（ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質など）とを反応させて Schiff 塩基を形成させる反応は、水性溶媒（水、リン酸塩緩衝液等）又は適当な有機溶媒（ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に上記アルデヒド化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒（クロロホルム、メタノール等）に脂質を溶解した溶液とを混合し、通常15～60℃の温度で反応させることができる。この反応時又は反応終了後に適当な還元剤（水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等の水素化ホウ素アルカリ塩など）を作用させて Schiff 塩基を還元することができる。なお、本反応方法で脂質結合グリコサミノグリカンを製造する際に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2価官能性のスペーサー化合物（例えば、エチレンジアミン等のアルキレンジアミン、又はリジン等のアミノ酸等）と上記アルデヒド化合物とを反応させて、アミノアルキル結合（ $-CH_2-NH-$ ）を形成させ、次いで上記スペーサー化合物の他方の官能基（例えばアミノ基）と反応し得る官能基（例えば、カルボキシル基）を有する脂質（例えば、モノアシルグリセロールコハク酸エステル等のモノアシルグリセロールジカルボン酸エステル）と反応させてもよい。

【0024】還元末端ラクトン化法

この方法は、GAGの還元末端の糖残基であるキシロース残基、ガラクトース残基、ウロン酸残基又はヘキシサミン残基を酸化することにより、還元末端のピラノース環を特異的に開環（開裂）させて該GAGの還元末端にカルボキシル基を形成させて、次いでラクトン形成反応に付すことによって該GAGの還元末端をラクトン構造とし、このラクトンと脂質の1級アミノ基とを反応させて酸アミド結合（ $-CO-NH-$ ）を形成させることによって、GAGと脂質とを共有結合させる方法である。GAGの還元末端の糖残基の酸化は、GAGに対して2～20当量程度、好ましくは5～15当量程度の酸化剤（ヨウ素、臭素等）を使用し、適当な水性溶媒（例えば、水、リン酸塩緩衝液等）中、通常0～40℃、好ましくは15～30℃で行うことができる。上記酸化反応後、強酸性陽イオン交換樹脂、例えばダウエクセス50

(商品名;ダウケミカル社、アンバーライトIR-120 (商品名;オルガノ社製)及び/又は酸(塩酸、硫酸等の無機酸、又は酢酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸の酸無水物)で処理することによって、GAGの還元末端が特異的にラクトン化されたラクトン化合物を製造することができる。得られたラクトン化合物と1級アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質)との反応は、適当な水性溶媒(水、リン酸塩緩衝液等)又は適当な有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)にラクトン化合物を溶解した溶液と、適当な有機溶媒(クロロホルム、メタノール等)に脂質を溶解した溶液とを混合し、5~80℃、好ましくは30~60℃の温度で反応させればよい。なお、還元末端限定酸化法の場合と同様に、1級アミノ基を有する脂質の代わりに、1級アミノ基を有する2価官能性のスペーサー化合物と上記ラクトン化合物とを反応させて酸アミド結合(-CO-NH-)を形成させ、スペーサー化合物の他方の官能基と脂質の官能基(例えばカルボキシル基)とを反応させてもよい。

【0025】その他の方法

上記以外の方法としては、例えばGAGのウロン酸部分のカルボキシル基と脂質の1級アミノ基とを反応させて、酸アミド結合(-CO-NH-)を形成させる方法が挙げられる。上記反応に際し、縮合剤(例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等)を用いて

酸アミド結合(-CO-NH-)を形成させるか、あるいはウロン酸部分のカルボキシル基を該縮合剤の存在下、活性化剤(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール等)と反応させて活性エステルとした後、該脂質と反応させて酸アミド結合(-CO-NH-)を形成させることができる。なお、上記反応においてGAGのウロン酸部分を有機溶媒に溶解可能な塩(トリエチルアミン、トリブチルアミン等のアミンの塩等)とし、反応を有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン等)中で行うことが好ましい。

【0026】代表的化合物

本発明薬剤の有効成分である脂質結合グリコサミノグリカンの好適な化合物を以下に例示する。

(1) ジパルミトイル-L-(α-ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸

原料

GAG: ヒアルロン酸(鶏冠由来、分子量1万)

脂質: ジパルミトイル-L-(α-ホスファチジル)

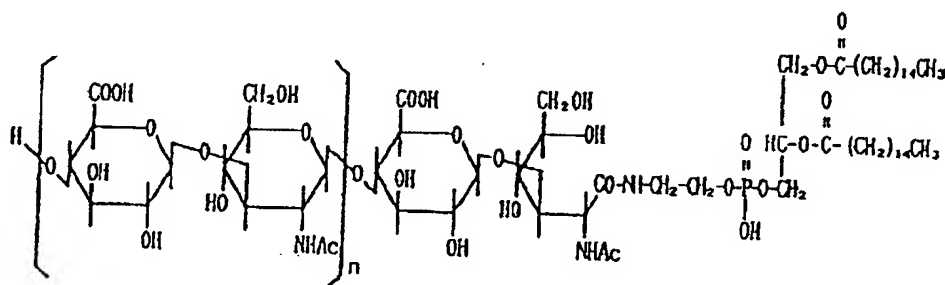
20 エタノールアミン

合成法

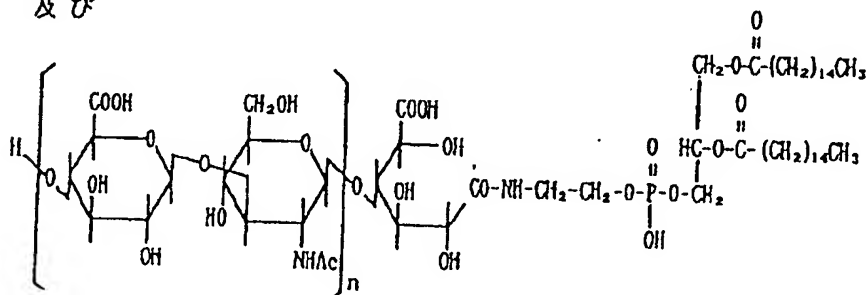
還元末端ラクトン化法(特開平4-80201号公報、実施例1-(2)-1)参照)

【0027】

【化4】



及び



n: 平均25

【0028】(2) ジパルミトイル-L-(α-ホスファチジル)エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸

原料

50 GAG: コンドロイチン硫酸(鯨軟骨由来、分子量3

万)

脂質 : ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル)

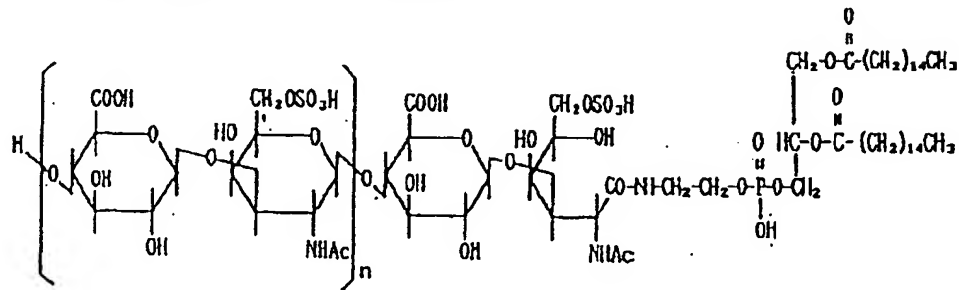
エタノールアミン合成法

還元末端ラクトン化法 (特開平 4 - 8 0 2 0 1 号公報、

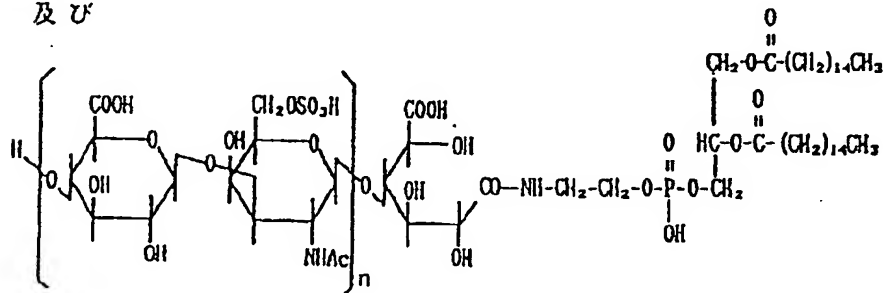
実施例 1 - (2) - 2) 参照)

【0029】

【化5】



及び



n : 平均 6 0

【0030】 (3) ステアロイルパルミトイルホスファ

チジルセリン結合コンドロイチン硫酸原料

GAG : コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来、分子量 3

万)

脂質 : ステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン

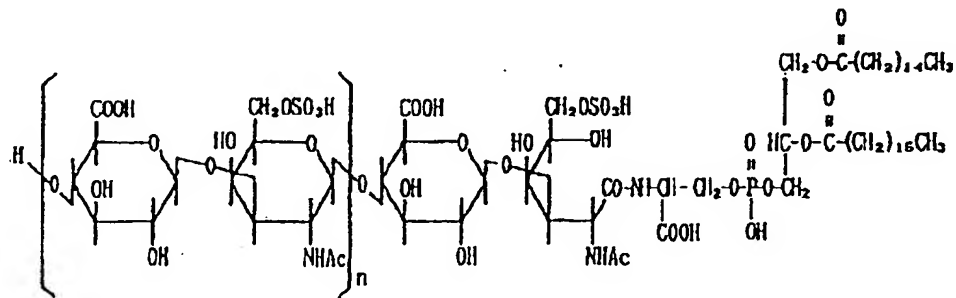
合成法

還元末端ラクトン化法 (特開平 4 - 8 0 2 0 1 号公報、

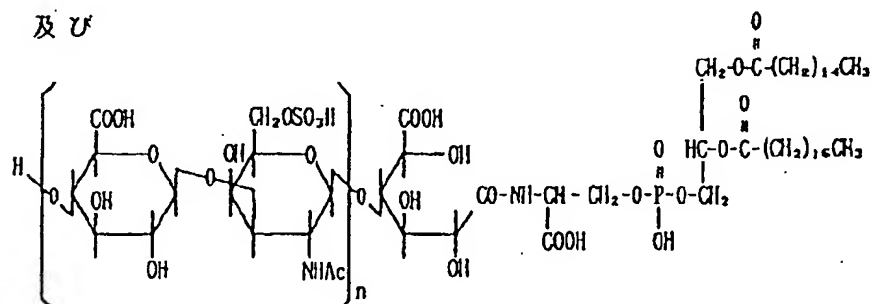
実施例 1 - (3) 参照)

【0031】

【化6】



及び



n : 平均 6 0

【0032】 (4) モノステアロイルグリセロール・コ
ハク酸エステル結合コンドロイチン硫酸

原料

GAG : コンドロイチン硫酸 (鯨軟骨由来、分子量3
万)

脂質 : モノステアロイルグリセロール・コハク酸エス

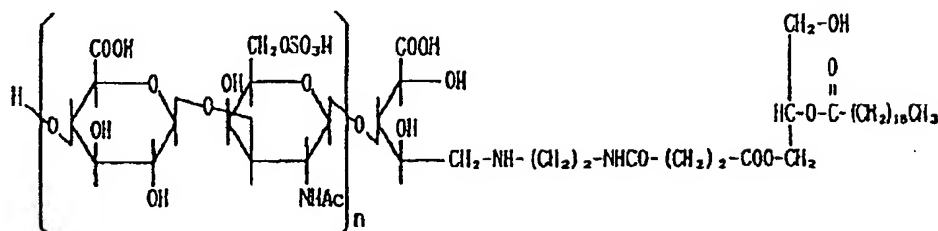
テル

合成法

還元末端アミン法 (特開平 4-80201 号公報、実施
例 2-(3) 参照)

【0033】

【化7】



n : 平均 60

【0034】 (5) ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル) エタノールアミン結合ヒアルロン酸

原料

GAG : ヒアルロン酸 (鶏冠由来、分子量1万)

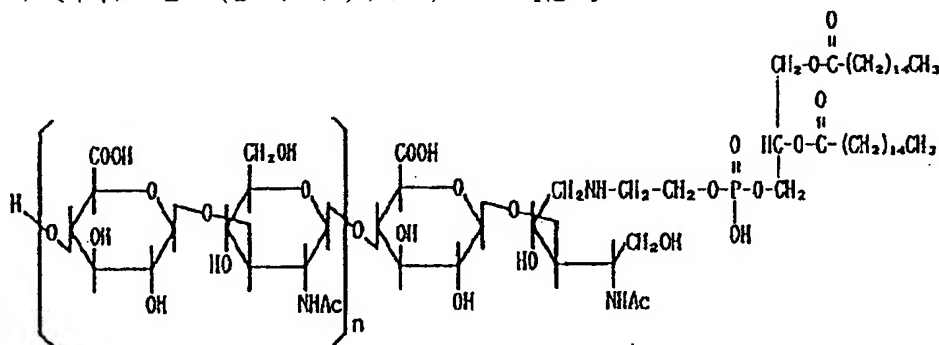
脂質 : ジパルミトイル-L- (α-ホスファチジル)

エタノールアミン合成法

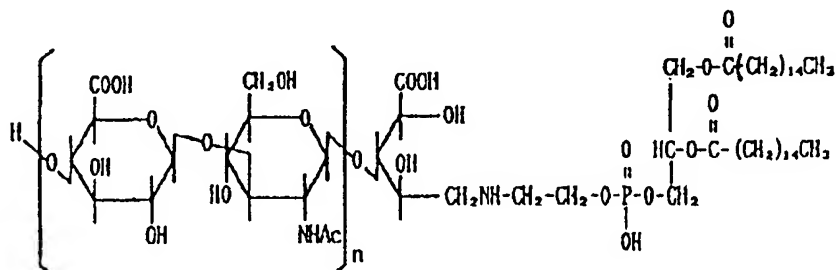
還元末端限定酸化法 (特開平 4-80202 号公報、実
施例 1-(2)-1) 参照)

【0035】

【化8】



及び



n : 平均 24

【0036】 本発明の神経疾患治療剤は、その有効成分 50 である脂質結合グリコサミノグリカン又はその塩 (以

下、脂質結合GAG(略すことがある)の有効量を、末梢神経系又は中枢神経系の障害に起因する神経疾患に罹患したヒトを含む哺乳動物に投与することによって該動物を治療することができる薬剤である。代表的な疾患として、例えば、外傷性の神経損傷や神経欠損に起因する神経障害(特に体性神経障害、さらに特に感覚神経障害)、代謝障害性多発性神経障害、機械的神経障害、毒性神経障害などの種々の末梢神経疾患;ならびに、例えば、脳卒中、脳梗塞、脳出血、脳外傷、記憶障害、老年痴呆、アルツハイマー病やパーキンソン氏病などの神経繊維が再生されることによって治療効果が期待される種々の中枢神経疾患が挙げられる。

【0037】本発明の神経疾患治療剤は、脂質結合GAGを経口的あるいは非経口的に投与(静脈内、筋肉内、皮下など組織内投与(注射)、経腸投与、経皮投与等)するための医薬品として、液体製剤、固体製剤、半固体製剤など任意の剤形に製剤化することが可能であり、任意の投与方法で患者に投与される。

【0038】該製剤は、脂質結合GAGに通常薬学的に許容される製剤補助剤を加えることにより常法に従って製造される。さらに公知の技術により持続性製剤とすることも可能である。

【0039】本発明の薬剤を中枢神経の障害に起因する神経疾患の治療に使用する場合、筋肉注射、静脈注射、皮下注射又は腹腔内注射が好ましい。

【0040】脂質結合GAGは、多くは水溶性であり、容易に液体製剤を製造することができる。注射剤等の液体製剤を製造するには、脂質結合GAGを必要に応じてpH調整剤(塩酸、水酸化ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなど)、等張化剤(塩化ナトリウム、ブドウ糖など)とともに注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンプルに充填するか、さらにマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチンなどを加えて真空下に凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤としてもよい。また、脂質結合GAGに、乳化剤(レシチン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油など)を加えて水中で乳化させ、注射用乳剤とすることもできる。

【0041】また、脂質結合GAGと賦形剤(乳糖、デンプン、結晶セルロースなど)、結合剤(白糖、ヒドロキシプロピルセルロースなど)、崩壊剤(カルボキシメチルセルロースなど)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム、タルクなど)などの製剤補助剤を用いて、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤等の経口投与用の固形製剤、あるいは脂質結合GAGに甘味剤(白糖、ソルビトールなど)、水、精油、エタノールなどを加えてシロップ剤などの経口投与用の液状製剤とすることもできる。

【0042】直腸投与剤は、脂質結合GAGに、カカオ脂肪酸のモノ、ジ又はトリグリセリド、ポリエチレングリコール等の座剤用基剤を加えた後、加温して熔融し、

これを型に流し込んで冷却するか、あるいは脂質結合GAGをポリエチレングリコール、大豆油等に溶解した後、ゼラチン膜で被覆して得ることができる。

【0043】さらに脂質結合GAGを、白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコール等に加えて軟膏剤とするか、必要に応じ加温し、混練して皮膚外用剤とすることができる。テープ剤は、脂質結合GAGに、ロジン、アクリル酸エステル重合体等の粘着剤を混練し、これを不織布等に展延して得ることができる。

【0044】吸入剤は、例えば薬学的に許容される不活性ガス等の噴射剤に、脂質結合GAGを溶解又は分散し、これを耐圧容器に充填して得ることができる。

【0045】また、注射剤としては目標臓器すなわち、例えば脳のような中枢神経系や、末梢神経束への移行速度の改善が可能なリポソーム製剤及び脂質エマルジョン製剤が挙げられる。脂質結合GAGは、それ自体水溶液中で脂質部分を介して、20~30分子が集合した会合体を形成しており(J. Biol. Chem., 268, 15779-15787 (1993))、更にリポソームを形成する両親媒性物質を使用することにより、より有効なリポソーム製剤が製造され得る。特に、ナノスフェアリポソーム(脂質超微粒子)は網内系組織に取り込まれることなく血中濃度を高め、薬効発現に必要な最小有効投与量を低下させることができるだけでなく、脳血液関門を通過しやすいので、脳の神経疾患の治療に使用する場合、好適である。リポソーム製剤は公知のリポソーム製造法(Liposomes: Physusial Struvture to Therapeutic Applications, pp. 51-82, Elsevier, Amsterdam (1981); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194-4198 (1978))に従って製造することができる。

【0046】リポソームの製造は、例えば以下の方法で行うことができる。上記両親媒性物質及び添加剤と脂質結合GAGとを有機溶媒(クロロホルム、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、ヘキサンなどの単独又は混合溶媒)に溶解あるいは混合し、フラスコなどの容器において不活性ガス(窒素ガス、アルゴンガスなど)存在下で有機溶媒を除去し、器壁に薄膜として付着させる。次いで、この薄膜に適当な水性媒体(生理食塩水、緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水など)を加え、攪拌機で攪拌する。小粒径のリポソームを得るためには、超音波乳化機、加圧型乳化機、フレンチプレス細胞破砕機などを用いてさらに分散させる。さらにこれをメンブレンフィルター処理することによって、粒径分布が制御されたナノスフェアリポソーム(脂質超微粒子;粒子径25~50nm程度)を得ることができる。また、リポソームを限外濾過、遠心分離、ゲル濾過などの分画処理に付し、リポソームから分離した脂質結合GAGを除去してもよい。

【0047】リポソームを形成する両親媒性物質として

は、天然リン脂質（卵黄レシチン、大豆レシチン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、カルジオリピンなど）又は合成リン脂質（ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンなど）等のリン脂質を使用する。また、膜の安定性、流動性、有効成分の膜透過性を改善するために、コレステロール類（コレステロール、エルゴステロール、フィトステロール、シトステロール、スチグマステロールなど）、リポソームに負電荷を付与することが知られている物質（ホスファチジン酸、ジセチルホスフェートなど）、正電荷を付与することが知られている物質（ステアリルアミン、ステアリルアミンアセテートなど）、酸化防止剤（トコフェロールなど）、油性物質（大豆油、綿実油、ゴマ油、肝油など）等、公知の種々の添加剤を使用しても良い。

【0048】上記製剤中の脂質結合GAGの含量は、剤形、投与方法、投与回数等によって変動するが、通常、注射剤の場合は0.1～10重量%程度、経口投与用製剤の場合は1～80重量%程度、外用剤の場合は0.1～10重量%程度である。

【0049】脂質結合GAGの投与量は、患者の年齢、症状、体重、投与方法によって異なり、一概には特定できないが、組織内投与（注射）の場合は1日量1～1,000mgを1回もしくは数回に分けて投与することが好ましい。

【0050】脂質結合GAGは低毒性の化合物であり、医薬としての安全性は極めて高い。脂質結合GAGの急性毒性を以下の方法で調べた。

【0051】4週齢のS i c - d d y系雌雄マウスを1週間予備飼育後、雄23～30g、雌20～25gの体重になった時点で、上述したジパルミトイル-L- α -ホスファチジル)エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸又はジパルミトイル-L- α -ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸を、各々5%の濃度になるように局方生理食塩水に溶解し、腹腔内に投与した。雌雄それぞれ1群10匹を用いて、LD₅₀値を算出した。その結果、いずれの化合物もLD₅₀値は2,000mg/kg以上であり、医薬としての安全性は問題ない。

【0052】

【実施例】

試験例1 PC12細胞の神経突起伸長への影響

末梢神経様細胞への分化能を持つ、ラット副腎髄質由来のPC12細胞株（大阪大学蛋白質研 晶中教授より供与）を、ラミニン（1、5、10 μ g/ml）（マウスEHS由来；新田ゼラチン社製）でコートした24穴培養皿（MS-8024R；住友ベークライト社製）に1 \times 1

0⁴個/cm²の密度で10%ウシ胎仔血清（FCS）含有ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中で37℃、5時間培養した。その後、上記培養液を除去し、ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸（CS-PE）含有、又は非含有のDMEM-ハムF12培地（Ham's F12）（1：1）混合培地を添加した。37℃で24時間培養後、細胞を2%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で固定後、PC12細胞から伸びた神経突起の状態を位相差顕微鏡で観察した。結果を図1に示す。なお、FCSはFlow Laboratories社から、DMEM及びハムF12培地は日水製薬社から購入した。またCS-PEは、ジパルミトイル-L- α -ホスファチジル)エタノールアミン結合コンドロイチン硫酸（原料として、GAGはコンドロイチン硫酸（鮫軟骨由来、分子量3万）、脂質はジパルミトイル-L- α -ホスファチジル)エタノールアミン、合成法として還元末端ラクトン化法（特開平4-80201号公報、実施例1-（2）-2））を使用した。PC12細胞の神経突起はラミニンコート濃度が高いほど数も多く、長い突起伸長であったが、CS-PEを含む培地に交換したものは、さらに長い神経突起伸長がみられた。

【0053】試験例2 ラット胎仔脳由来初代培養神経細胞の突起伸長促進効果

胎生18日齢のラットの脳（海馬）を採取し、パパイン（9units/ml、Worthington社製）処理して、神経細胞を分離・調製した（Neurosci. Res., 8, 69-82(1990)）。20 μ g/mlのポリリジン（シグマ社製）を加え37℃で一晩、前処理して、水で3回洗浄した12穴培養皿（ファルコン社製）に、各種グリコサミノグリカン〔コンドロイチン硫酸（CS）、ヒアルロン酸（HA）〕50 μ g/ml及び各種脂質結合グリコサミノグリカン〔ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸（CS-PE）、ホスファチジルエタノールアミン結合ヒアルロン酸（HA-PE）〕0.5 μ g/mlを加え、37℃で24時間処理した。この培養皿に、該神経細胞を10 \times 10⁴個/cm²の密度で接種し、5%新生ウシ血清（三菱化学社製）と5%加熱処理ウマ血清（ギブコ社製）及び90%ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）-ハムF12培地（Ham's F12）（1：1）混合培地（1.5mM HEPES含有）からなる培地で、37℃で24時間培養した。培養液の半量を4%パラホルムアルデヒドに交換して、神経細胞を固定し、位相差顕微鏡でそれぞれの神経細胞から伸展した神経突起を観察した。結果を図2に示す。CSは鮫軟骨由来、分子量3万、HAは鶏冠由来、分子量1万、CS-PEは試験例1で使用したのと同じものを、HA-PEは、ジパルミトイル-L- α -ホスファチジル)エタノールアミン結合ヒアルロン酸（原料としてGAGはヒアルロン酸（鶏冠由来、分子量1万）、脂質はジパルミトイル-

L-(α -ホスファチジル)エタノールアミン、合成法として還元末端ラクトン化法(特開平4-80201号公報、実施例1-(2)-1))を使用した。グリコサミノグリカンのみの処理では50 μ g/mlでも神経突起形成にほとんど影響を示さなかった。しかし、脂質結合グリコサミノグリカンでは、CS-PE及びHA-PEそれぞれ0.5 μ g/mlの処理で明らかな神経突起伸展促進の効果がみられた。

【0054】試験例3 ラット胎仔脳由来初代培養神経細胞の突起伸展促進効果

試験例2と同様にして、胎生18日齢のラット脳(海馬)から神経細胞を調製した。試験例2と同様にポリリジンで前処理して、水で3回洗浄した96穴培養皿(コースター社製)に濃度の異なる各種脂質結合グリコサミノグリカン[ホスファチジルエタノールアミン結合ヒアルロン酸(HA-PE)0.1及び0.5 μ g/ml、ホスファチジルエタノールアミン結合コンドロイチン硫酸(CS-PE)(0.004、0.02、0.1、0.5及び1.0 μ g/ml)]を加え、37℃で24時間処理し、脂質結合グリコサミノグリカンでコートされた培養皿を調製した。この培養皿に、該神経細胞を 10×10^4 個/cm²の密度で接種し、5%新生ウシ血清(三菱化学社製)、5%加熱処理ウマ血清(ギブコ社製)及び90%ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)-ハムF12培地(Ham's F12)(1:1)混合培地(1.5mM HEPES含有)からなる培地で、37℃で24時間培養した。神経細胞を固定後、神経突起を、抗ニューロフィラメント抗体(RT97)を使ってP. Dohertyらの方法(J. Neurochem., 42, 1116-1122 (1984))で、酵素抗体法によって免疫染色した。すなわち、培養液の半量を4%パラホルムアルデヒドに交換し、15分間保存して神経細胞を固定した。-20℃に冷却したメタノールで30分間処理し、CMF-PBS(カルシウム・マグネシウム非含有リン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄した。該培養皿に抗ニューロフィラメント抗体(RT97)(ペーリンガー・マンハイム社製)の5%ヤギ血清含有CMF-PBS溶液(10 μ g/ml)を加え、4℃で

一晚処理した。CMF-PBSで洗浄後、1:1、000倍希釈のパーオキシダーゼ結合抗マウスイムノグロブリンを加え、室温で60分間インキュベートした。CMF-PBSで3回、蒸留水で1回洗浄後、50 μ lの100 μ g/mlテトラメチルベンジジン(TMBZ)(同人化学社製)及び0.001% H_2O_2 の0.1M酢酸ナトリウム(pH6.0)溶液を加え、インキュベートした。50 μ lの1N硫酸を加え反応を止め、510nmの吸光度を測定した。細胞数あたりの吸光度を算出することで、伸展した神経突起量を定量化した。結果を図3に示す。HA-PE及びCS-PEは試験例2で使用したのと同じものを使用した。HA-PEは0.1~0.5 μ g/mlの濃度の処理で、CS-PEは0.02~1.0 μ g/mlの濃度の処理で、それぞれ神経突起伸展の促進作用がみられた。特にHA-PEは0.5 μ g/mlのコートで約160%、CS-PEでは1.0 μ g/mlのコートで約150%コントロールよりも高いニューロフィラメント産生の増加、すなわち神経突起伸展の増加がみられた。

10 【0055】試験例4 ラット神経損傷モデルに対する効果

ネンブータル麻酔下に11週齢のSD系雄性ラット左大腿部外側を切開し、座骨神経を露出し、12cmのペアン鉗子で10秒間圧迫挫滅した。右足は無処置群であり、対照足とした。挫滅後すぐに、被験液(CS-PE 10mg/ml PBS溶液)又は対照液(PBS)0.05mlを損傷部位周辺に滴下した。その後足趾の開閉及び足の裏への荷重に対する障害を運動機能障害として、足底部の損傷、足趾の損傷及び爪ののびの悪さと脱落を感覚神経のマヒあるいは障害による外傷としてその程度を表1のスコア表により判定して測定した。また疼痛反応はノギスでピンチングして測定した。この試験はPain. 47 (1991) p31-39に記載の方法に準じた。CS-PEは試験例1で使用したのと同じものを使用した。

【0056】

【表1】

表 1 : スコア判定法

運動機能障害度

動物を透明アクリル板に乗せて両後肢の足底を撮影した。得られた画面上の第 1 趾 - 第 5 趾間の距離を測定し、足趾の開閉度を求め、また足の裏への荷重度も求めた。

開閉度と荷重度に対する最高障害スコアをそれぞれ 10 点と 6 点とした。

外傷度 (感覚神経のマヒあるいは障害によりもたらされる自傷行為等の肉眼的観察)

足底部の損傷 (部分的欠落)	5 点 / 足
足趾の損傷 (短い)	2 点 / 趾
爪の脱落	1 点 / 趾
爪の伸びが悪い	0.5 点 / 趾

【0057】神経損傷後 1 週間毎に運動機能障害及び外傷に関して観察し、両者の程度を総障害度スコアとして測定した。図 4 に結果を示す。

【0058】PBS のみを滴下した対照群では神経損傷後 2 週目以降に足趾の自傷 (噛みちぎり) 例が経時的に増え、5 週目では 5 / 5 例すべてにみられた。CS - P E 投与群ではラットの足の外傷はほとんど見られず、対照群と大きく異なる効果がみられた。

【0059】足の外傷は、末梢神経の損傷により下肢の感覚神経機能が損なわれたために、足趾を噛み切るなどの自傷等が生じたものと考えられる。CS - P E の投与により外傷がほとんど見られなかったことから、CS - P E は末梢神経機能の回復を促進し、感覚神経を含めた末梢神経の障害に起因する神経疾患に有効であることが示された。

【0060】製剤例

無菌的に調製したステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン結合コンドロイチン硫酸 (CS - PS) 及びジパルミトイル - L - (α - ホスファチジル) エタノールアミン結合ヒアルロン酸 (HA - PE) のそれぞれ 50 mg を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に室温で溶解して 50 ml とした。これを無菌ろ過 (孔径 0.22 μm のメンブレンフィルター使用) し、2.5 ml ずつ分注後封入し、1 アンプルあたり 2.5 mg の上記有効成分をそれぞれ含有する注射用薬剤を製造した。なお、CS - P S は、ステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン結合コンドロイチン硫酸 (原料として GAG はコンドロイチン硫酸 (軟骨由来、分子量 3 万)、脂質はステアロイルパルミトイルホスファチジルセリン、合成法は還元末端ラクトン化法 (特開平 4 - 80201 号公報、実施例 1 - (3))、HA - PE はジパルミトイル - L - (α - ホスファチジル) エタノールアミン結合ヒアルロン酸 (原料としては GAG はヒアルロン酸 (鶏冠由来、分子量 1 万)、脂質はジパルミトイル - L - (α - ホスファチジル) エタノールアミン、合成法は還元末端限定

酸化法 (特開平 4 - 80202 号公報、実施例 1 - (2) - 1)) を使用した。

【0061】

【発明の効果】本発明の脂質結合 GAG を有効成分とする神経疾患治療剤は、末梢及び中枢の神経細胞の神経突起伸張促進効果、及び神経損傷や神経欠損によって障害をうけた神経機能の回復促進効果を有し、また神経細胞の変性脱落防止効果や神経繊維再生効果が期待されることから、末梢神経系及び中枢神経系の種々の疾患の治療に有効である。例えば、外傷性の神経損傷や神経欠損に起因する神経障害 (特に体性神経障害、さらに特に感覚神経障害)、代謝障害性多発性神経障害、機械的神経障害、毒性神経障害などの種々の末梢神経系疾患; ならびに、例えば、脳卒中、脳梗塞、脳出血、脳外傷、記憶障害、老年痴呆、アルツハイマー病やパーキンソン氏病などの神経繊維が再生されることによって治療効果が期待される種々の中枢神経疾患に有効である。

【0062】また、本発明薬剤の有効成分である脂質結合 GAG は、毒性の極めて低い化合物であるので、本発明薬剤はほとんど副作用がないものと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】PC12 細胞に対する CS - P E の神経突起伸張促進効果を示す、生物の形態の位相差顕微鏡写真である。

A : ラミニン 10 μg/ml	CS - P E	無し
B : ラミニン 10 μg/ml	CS - P E	100 μg/ml
C : ラミニン 5 μg/ml	CS - P E	無し
D : ラミニン 5 μg/ml	CS - P E	100 μg/ml
E : ラミニン 1 μg/ml	CS - P E	無し
F : ラミニン 1 μg/ml	CS - P E	100 μg/ml

【図 2】ラット胎仔脳由来初代培養神経細胞の神経突起伸張に対する、GAG 及び脂質結合 GAG の影響を示す、生物の形態の位相差顕微鏡写真である。

A : コントロール
B : CS (コンドロイチン硫酸) 50 μg/ml

C: CS-PE 0.5 μ g/ml
 D: HA (ヒアルロン酸) 50 μ g/ml
 E: HA-PE 0.5 μ g/ml

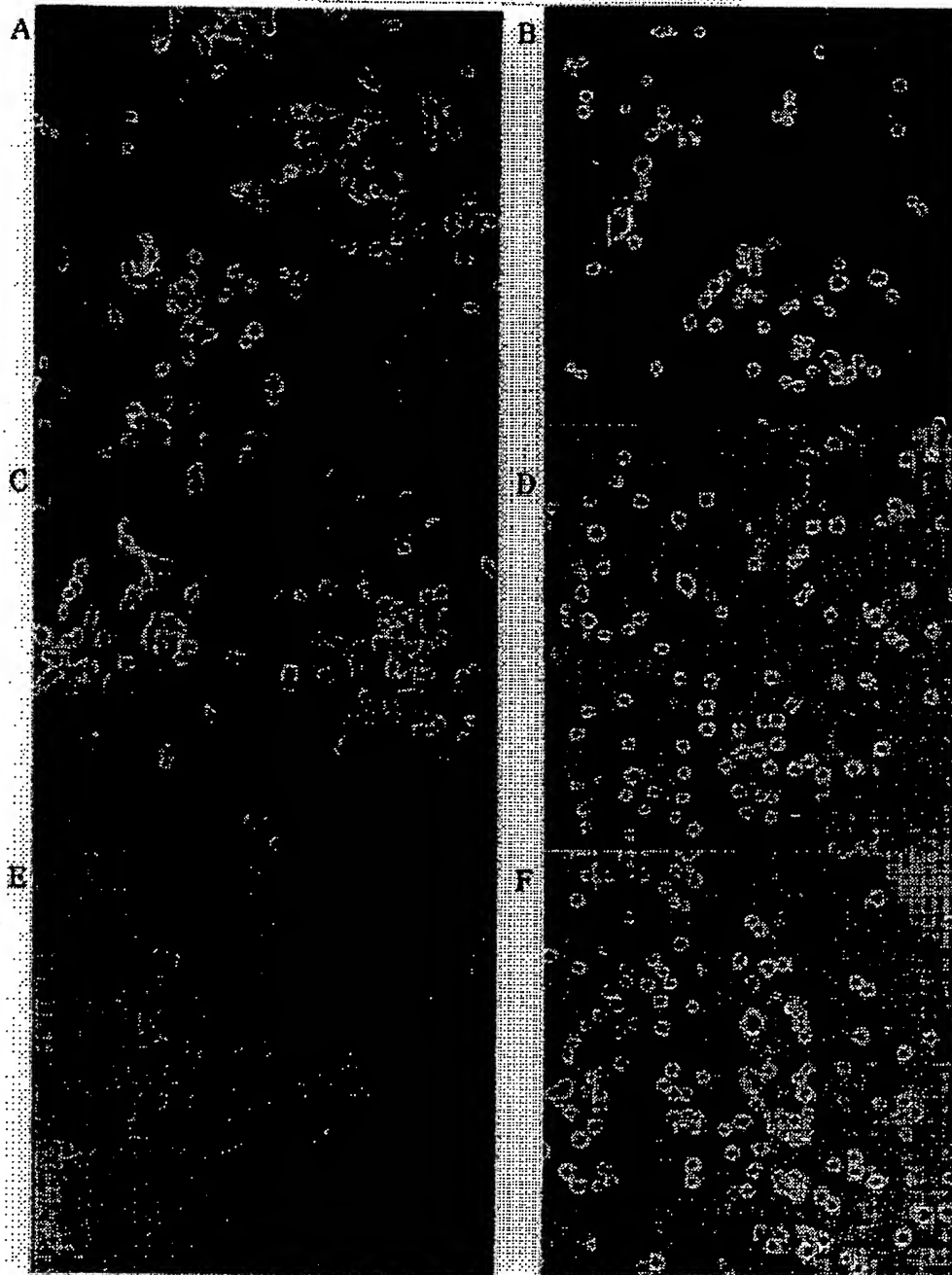
【図3】ラット胎仔脳由来初代培養神経細胞における、
 HA-PEとCS-PEの神経突起伸展促進効果を示す

グラフである。

【図4】ラット座骨神経損傷モデルにおける、運動機能
 障害度と外傷度をスコア判定法により総障害度スコア
 ーとして、経時的に示したグラフである。

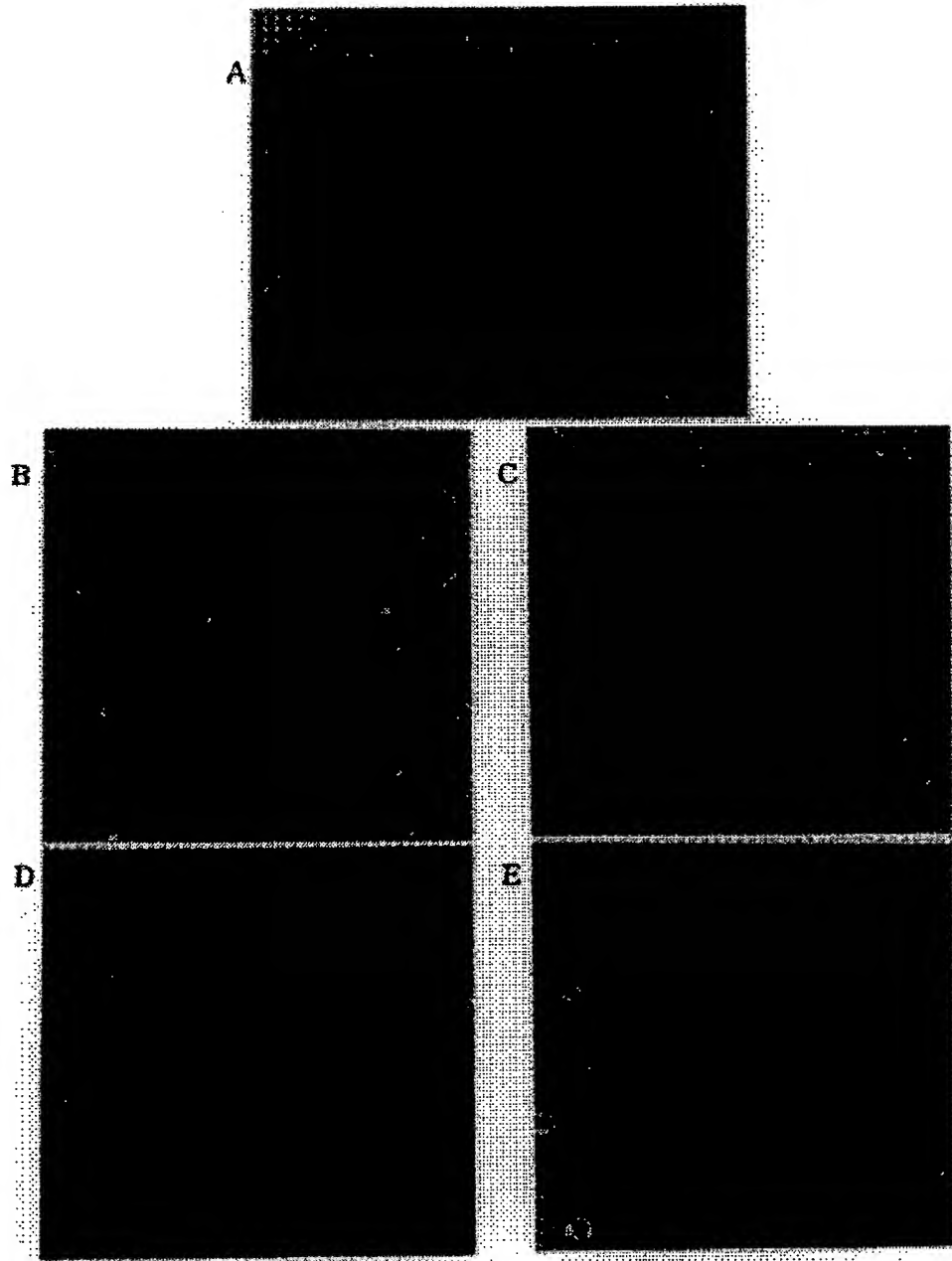
【図1】

図面代用写真

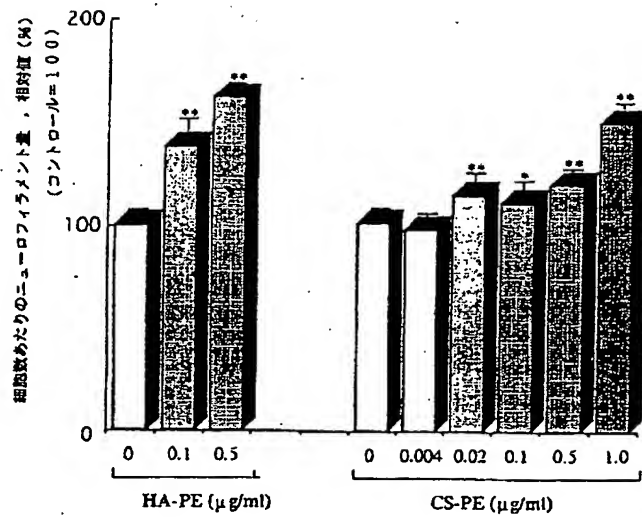


【図2】

図面代用写真



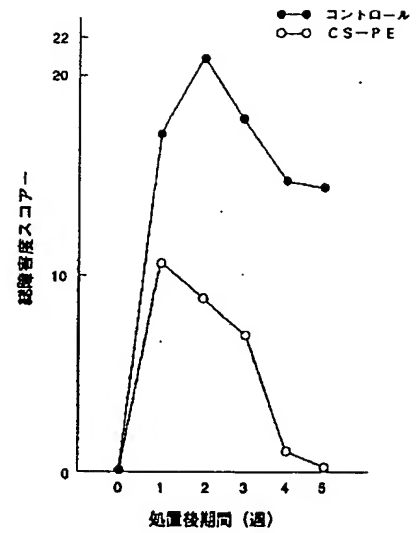
【図3】



** : P < 0.01

* : P < 0.05

【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
C08B 37/08

識別記号 庁内整理番号

F I
'C08B 37/08技術表示箇所
Z(72) 発明者 木全 弘治
愛知県名古屋市中天白区植田山1丁目1404番
地(72) 発明者 後藤 幸子
東京都東村山市栄町1-39-34

THIS PAGE BLANK (US 10)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USP 10)